

2. Das Verfahren ist außerordentlich *spezifisch*, da die Intensität der charakteristischen Phosphor-Atomlinie ausgenutzt wird und es wegen der hohen Temperatur völlig gleichgültig ist, in welcher Bindung und in welcher Mischung mit anderen Elementen es vorliegt.
3. Die Probenvorbereitung und Messung sind *einfach* und benötigen wenig Zeit. Das Ergebnis steht

spätestens nach 30 Minuten zur Verfügung. Bei der chemischen Methode werden allein für die Veraschung 5 Stunden benötigt.

Ein wesentlicher Nachteil ist es, daß der benutzte Plas-mabogen noch nicht im Handel ist.

Frau I. HOFMEISTER und Frau R. RISTIG danken wir für die sorgfältige Durchführung der chemischen Bestimmungen.

Literatur

1. HERRMANN, R. und K. RÖTGER, diese Z. 4, 217 (1966). — 2. ZÖLLNER, N., diese Z. 1, 18 (1963). — 3. BARTLETT, G. R., J. biol. Chemistry 234, 466 (1959). — 4. BÜTTNER, H., diese Z. 3, 69 (1965).

- 5. GEBELEIN, H. und I. HEITE, Statistische Urteilsbildung, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1951). — 6. RAUSCH, L. und H. GRAUL, Ärztl. Wschr. 4, 591. (1949).

Dr. med. Dr. rer. nat. D. Stamm
Klin.-chem. Abt. an der
Chirurg. Universitätsklinik
63 Gießen, Klinikstr. 37

Mikrolitermethode zur Bestimmung von Serum-Eisen

Von D. STAMM, HJ. STAUDINGER und W. WEIS

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut (Direktor: Prof. Dr. Hj. Staudinger) und der Klinisch-chemischen Abteilung (Leiter: Dr. Dr. D. Stamm) an der Chirurgischen Universitätsklinik der Universität Gießen

(Eingegangen am 6. April 1966)

Es wird eine Mikrolitermethode zur Bestimmung des Serumeisens unter Verwendung eines neuen Komplexbildners mit hohem molaren Extinktionskoeffizient beschrieben, für die nur 50 μ l Serum benötigt werden und die zuverlässiger als die Millilitermethode ist, wie sich aus der Qualitätskontrolle und Richtigkeitsprüfung ergibt.

A microlitre method for the determination of serum iron is described. A new complexing agent with a high molar extinction coefficient is used. Only 50 μ l of serum are required and, as shown by quality control and accuracy tests, it is more reliable than the millilitre method.

Bei den bisher üblichen *Millilitermethoden* zur Bestimmung des Serum-Eisens gibt es drei Schwierigkeiten: Erstens die Beschaffung der einwandfreien Probemengen von 1—2 Milliliter; zweitens die genaue Einhaltung des pH im Bestimmungsansatz; drittens die Reinigung der Glasgeräte von Eisenspuren (1). Nachdem nun KRÖHNKE und STAUDINGER mit ihren Mitarbeitern (2) einen neuen Komplexbildner mit einem ungewöhnlich hohen, nur wenig vom pH abhängigen molaren Extinktionskoeffizienten ($\epsilon = 26900$) für die Serumeisenbestimmung eingeführt haben, erscheint es sinnvoll, dieses Verfahren als *Mikrolitermethode* (3) auszuarbeiten und seine Zuverlässigkeit, Präzision und Richtigkeit zu prüfen. Denn zu allen anderen Vorzügen der Mikrolitermethoden kommt der Vorteil, daß man bei dem Mikrolitersystem „Eppendorf“¹⁾ die Reaktionsgefäße und die Pipettenspitzen unmittelbar aus den zugeschweißten Beuteln des Herstellers entnehmen und ohne vorherige Reinigung für die Eisenbestimmung verwenden kann (4). Da man nur ganz geringe Reagenzienmengen benötigt, kann man „super-reine“ Chemikalien verwenden; dadurch wird eine Vielzahl von Fehlermöglichkeiten ausgeschaltet.

Methode

Die Untersuchungen werden mit dem Mikrolitersystem „Eppendorf“ durchgeführt. Die Konzentration der

¹⁾ Hersteller: Fa. „Eppendorf Gerätebau“, Netheler und Hinz GmbH, Hamburg.

Reagenzien und der Volumina sind auf dieses System abgestimmt.

Reagenzien

Für die Lösungen und die Reaktionsansätze wird eisenfreies aus Quarz destilliertes, entmineralisiertes Wasser verwendet.

6 N-Salzsäure: Aus 60 ml Salzsäure (D = 1,15) „ultrarein“ (Fa. Merck Nr. 318), die etwa 9,5 N ist, werden 95 ml 6 N Salzsäure durch Zugabe von 35 ml Wasser hergestellt.

20proz. Trichloressigsäure: Zu 30 ml 40-proz. Trichloressigsäure (CCl_3COOH) p. a. zur Eisenbestimmung (Fa. Merck Nr. 811) sind 30 ml Wasser hinzuzugeben.

3,5 M Natriumacetat-Lösung pH 4,8—5,4: Man löst 28,7 g Natriumacetat (CH_3COONa) „ultrarein“ (Fa. Merck Nr. 6264) in 100 ml Wasser.

Ascorbinsäure $1,5 \cdot 10^{-2}$ M: Man löst 2,64 mg p. a. Ascorbinsäure (Fa. Merck Nr. 127) in 100 ml Wasser.

Eisenreagenz: 2,6-Di-[pyridyl-(2)]-4-[p-methoxy-phenyl]-pyridin $5 \cdot 10^{-4}$ M. Man löst 17,0 mg des Reagenzes, dessen Darstellung bei KRÖHNKE und STAUDINGER (2) beschrieben ist, in 100 ml Isopropylalkohol (Fa. Merck Nr. 9634).

Eisenstandardlösung 1000 μ g Fe/100 ml: Man wiegt 70,4 mg Mohrsches Salz, Ammoniumeisen-(II)-sulfat, $[(\text{NH}_4)_2 \text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$, M = 392,16 p. a. (Fa. Merck Nr. 3792) ein und füllt in einem Meßkolben auf 1000 ml auf.

Arbeitsstandard 100 μ g/100 ml: Die Eisenstandardlösung wird in einem 100-ml-Meßkolben 1+9 mit Wasser verdünnt.

Arbeitsgang

Man setzt in jeder Serie 3 Leerwerte, 3 Standards und je 1 Probe an und verfährt weiter nach Tabelle 1:

Tab. 1
Pipettierschema (Mengen in μl)

Reagenz	Leerwert	Standard	Probe
Wasser	50	—	—
Standard	—	50	—
Serum	—	—	50
6 N HCl	50	50	50

Die Ansätze auf dem Rüttler gut mischen und 15 Min. stehen lassen

Wasser	100	100	100
Trichloressigsäure	100	100	100

Die Ansätze auf dem Rüttler gut mischen, für 3 Min. in der Mikrozentrifuge zentrifugieren; Überstand abnehmen in neues

Reaktionsgefäß	200	200	200
Natriumacetat	200	200	200
Ascorbinsäure	50	50	50
Eisen-Reagenz	500	500	500

Die Ansätze auf dem Rüttler gut mischen und 15 Min. stehen lassen

Messung

Im Spektralphotometer (Fa. Zeiss „PMQ II“ mit Mikroansatz) werden bei 568,5 m μ in Lowry-Bessy Küvetten von 2 cm Schichtdicke die Extinktionen [E] der Standards und der Proben gegen Wasser abgelesen. Den Leerwert prüft man vorher durch Ablesen seiner Extinktion gegen Wasser.

Berechnung

$$(E_{\text{Probe}} - E_{\text{Leerwert}}) \cdot \frac{K_{\text{Standard}}}{E_{\text{Standard}} - E_{\text{Leerwert}}} = \mu\text{g Eisen}/100\text{ml Serum}$$

K = Konzentration

Eichung

Man gibt von der Eisenstandardlösung (1000 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$) die folgenden Mengen mit geeichten Vollpipetten in 100 ml Meßkolben und füllt mit Wasser bis zur Marke auf:

Tab. 2
Pipettierschema für die Eichkurvenverdünnung

Standard	4	6	8	10	15	20	30	40
1000 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ (ml)	4	6	8	10	15	20	30	40
Endvolumen (ml)	100	100	100	100	100	100	100	100
Konzentration ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$)	40	60	80	100	150	200	300	400

Mit jeder Verdünnung werden 3 Ansätze nach dem Pipettierschema der Tabelle 1 gemacht und die abgelesenen Extinktionen nach Abzug des Leerwertes gemittelt. Die Extinktionen sind aus der Eichkurve (Abb. 1) abzulesen. Die Eichkurve ist bis zu 400 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ völlig linear. Der Durchmesser der Punkte beträgt 3 Standardabweichungen der Methode.

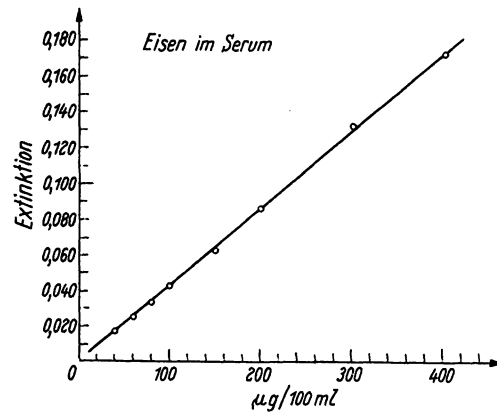


Abb. 1
Eichkurve zur Eisenbestimmung

Kontrolle der Methode

Die Präzision (5, 6) (precision) in der Serie wurde durch jeweils 25 Bestimmungen eines Serums hoher Eisenkonzentration und eines Serums niedriger Eisenkonzentration geprüft. Die absoluten Werte der Standardabweichung sind in beiden Konzentrationsbereichen gleich, die Variationskoeffizienten entsprechend verschieden. Die Präzision von Tag zu Tag ist aus einer Qualitätskontrolle (6) mit „Qualtrol“⁽²⁾ über einen Monat errechnet. Im Verlaufe dieses Monats haben sich keine nennenswerten Abweichungen über den Kontrollbereich-Mittelwert ± 2 Standardabweichungen, hinaus ergeben, d. h. die Methode ist nie aus der Kontrolle geraten (Tab. 3).

Die Richtigkeit (5, 6) (accuracy) wurde einmal durch eine tägliche Bestimmung von „Monitrol I“⁽²⁾ über 17 Tage geprüft; es ergab sich infolge der Mitführung eines inneren Standards keine wesentlich größere Abweichung als in der Serie. Der Variationskoeffizient betrug bei einem Mittelwert von 96 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ 1,68%.

Zum anderen prüften wir die Richtigkeit durch Zuzusatzversuche zu jeweils 1000 μl Qualtrol, dem wir zwischen 10 und 100 μl Eisenstammlösung zusetzten (Tab. 4):

Tab. 4
Wiederfindung

Vorgegebene Konzentration ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$)	187,3	147,8	123,6	109,5
bestimmte Konzentration ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$)	184,8	148,5	120,5	106,1
Wiederfindung (%)	98,7	100,5	97,5	96,9

Tab. 3
Präzision der Eisenbestimmung

	Mittelwert ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$)	Standardabweichung ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$)	Variationskoeffizient (%)
In der Serie	174,6	$\pm 1,63$	0,96
unter Routinebedingungen	95,4	$\pm 1,60$	1,63
von Tag zu Tag (Routinebedingungen)	96,0	$\pm 1,62$	1,68

²⁾ Hersteller: Fa. Dade Reagents, Inc., Miami, USA; Alleinvertrieb für Deutschland: Asid-Institut GmbH, München 13, Schließfach 420.

Diskussion

Die Mikrolitermethode hat gegenüber der Millilitermethode folgende Vorzüge:

1. Sie ist zuverlässiger; die Standardabweichung beträgt 1,6 gegenüber 2,7 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ bei der Millilitermethode.
2. Die Probemenge beträgt ein Zehntel der Millilitermethode.
3. Sie ist billiger, weil die hohen Reinigungskosten für

die Glasgeräte entfallen; man kann fabrikneue Kunststoff-Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen verwenden.

4. Die Infektionsgefährdung ist wesentlich geringer als bei der Millilitermethode, weil die Versuchung, Proben mit dem Mund in die Pipetten anzusaugen, entfällt und die infizierten Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen sofort weggeworfen werden.

Frau I. HOFMEISTER danken wir für die sorgfältige Durchführung der Bestimmungen.

Literatur

1. GOVANELLO, T. J. und T. PETERS in: D. SELIGSON, Standard Methods of Clinical Chemistry, Bd. IV, S. 139—150, Academic Press, New York-London (1963).
2. DEGGAU, E., F. KRÖHNKE, K. E. SCHMALKE, HJ. STAUDINGER und W. WEIS, diese Z. 3, 102 (1965).
3. BÜTTNER, H., Dtsch. med. Wschr. 88, 910 (1963).
4. GLADTKE, E., H. BÜTTNER und D. STAMM, diese Z. 3, 61 (1965).

5. BÜTTNER, H., Mikroliteranalysen, in: Handbuch der Kinderheilkunde Bd. 2, 1. Teil, S. 860—874, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1966).
6. HENRY, R. I. und R. L. DRYER in: D. SELIGSON, Standard Methods of Clinical Chemistry Bd. IV, S. 205—237, Academic Press, New York-London (1963).

Dr. med. Dr. rer. nat. D. Stamm
Klin.-chem. Abteilung
an der Chirurg. Universitätsklinik
63 Gießen, Klinikstr. 37

Die enzymatische Blutzucker-Bestimmung in vitro und in vivo mit dem Auto-Analyzer

Von E. KAWERAU

Aus dem Department of Chemical Pathology, St. James' Hospital, London

(Eingegangen am 28. Februar 1966)

Im ersten Abschnitt wird die Bestimmung von Glukose in Blut- und Liquorproben mit dem Glukose-Oxydase-Peroxydase System beschrieben; o-Tolidin dient als Farbreagenz. Die Technik und die Grundprinzipien, die der Anlage des Schlauch-Verteilersystems zugrunde liegen, werden eingehend besprochen. Die Methode erlaubt es, 40 Bestimmungen in der Std. zu machen; von der Blutentnahme bis zum ausgewerteten Resultat werden nur 8 Min. benötigt. Im zweiten Abschnitt wird die Glukose im Blut laufend am Patienten bestimmt, der durch einen intra-venösen Katheter direkt mit dem „Technicon“ Auto-Analyzer verbunden ist. Die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit beider Methoden sind dargestellt und statistisch gesichert.

A rapid method is described for the determination of blood and c. s. f. glucose with the glucose-oxydase-peroxidase system employing o-tolidine as the colour reagent. Some of the fundamental principles underlying the construction of the manifold are discussed. The method allows 40 determinations per hour to be made and no more than 8 minutes need elapse after bleeding the patient and the readout of the result. In the *in vivo* technique, the patient is connected directly to the „Technicon“ Auto-Analyzer by indwelling catheter in an ante-cubital vein, but basically, it is the same method. The accuracy and reproducibility of the method has been tested and the results have been submitted to the usual statistical check.

Eine schnelle, spezifische und störungsfreie Bestimmung der Glukose im Blut ist für die Klinik von größter Bedeutung. Unsere Methode, die in den letzten Jahren entwickelt wurde, hat sich als einfach und zuverlässig erwiesen, und da sie anderen Methoden gegenüber gewisse Vorzüge hat und vor allen Dingen schneller arbeitet, soll sie hier eingehend beschrieben werden. Außerdem soll die Methode mir hier als Modell zur Erläuterung einiger Grundprinzipien der Konstruktion neuer Verteiler-Schlauchsysteme für den Auto-Analyzer dienen. In manchen Publikationen zu diesem Thema fehlen die elementarsten Angaben, so daß es oft unmöglich ist, danach zu arbeiten. Diesem Zustand versucht ein Sonderausschuß der „British Association of Clinical Biochemists“ abzuhelpen, indem er in einer Arbeitsgemeinschaft die

Instrumente der „Technicon Company“ geprüft hat und zu dem Schluß gekommen ist (1), daß jede neu veröffentlichte Methode, die mit dem Auto-Analyzer arbeitet, folgende Angaben enthalten muß:

- a) Photographie einer Serie von Eichkurven aus der der Bereich und die Reproduzierbarkeit der Methode zu erkennen ist;
- b) Angabe der gemessenen Geschwindigkeit mit der der Probennehmer arbeitet;
- c) Angabe der gemessenen Geschwindigkeit des Schreibers;
- d) Angabe der wirklichen Umdrehungszahl der Walzenpumpe;
- e) Förderleistung der Pumpenschläuche bei 15 Sek./Umdrehung der Walzenpumpe;
- f) Temperatur des Dialysators und anderer Heizbäder;
- g) Volumen der Heizschlangen, falls solche Verwendung finden;
- h) Raumtemperatur.